

07-14

REC'D 18 OCT 1999

09/744230

PCT/JP99/04718

WIPO PCT

日本国特許庁

E-U

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

31.08.99

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1998年 8月31日

出願番号

Application Number:

平成10年特許願第244755号

出願人

Applicant (s):

工業技術院長

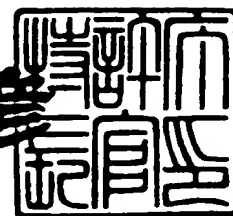
PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年10月 1日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特平11-3065830

【書類名】 特許願

【整理番号】 117F0059

【提出日】 平成10年 8月31日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N

【発明の名称】 機能性核酸転写用発現系

【請求項の数】 7

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東1-1-4 工業技術院 産業技術融合領域研究所内

【氏名】 多比良 和誠

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東1-1-4 工業技術院 産業技術融合領域研究所内

【氏名】 大川 淳

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東1-1-4 工業技術院 産業技術融合領域研究所内

【氏名】 小関 しおり

【特許出願人】

【識別番号】 000001144

【氏名又は名称】 工業技術院長 佐藤 壮郎

【指定代理人】

【識別番号】 220000415

【氏名又は名称】 工業技術院 産業技術融合領域研究所長 岸 輝雄

【代理関係の特記事項】 特許出願人 工業技術院長の指定代理人

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1
【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 機能性核酸転写用発現系

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記の塩基配列(I) または(II)を持つヌクレオチド配列を含むリボザイム。

塩基配列(I): 5'-ACCGUUGGUUCCGUAGUGUAGUGGUUAUCACGUUCGCCUAACACGCGAAAGGUCC
CCGGUUCGAAACCGGGCACUACAAACACAACACUGAUGAGGACCGAAAGGUCCGAAACGGGCACGUCGGAAA
CGGUUUUU-3'

塩基配列(II): 5'-ACCGUUGGUUCCGUAGUGUAGUGGUUAUCACGUUCGCCUAACACGCGAAAGGUC
CCCGGUUCGAAACCGGGCACUACAAACCAACACACAACACUGAUGAGGACCGAAAGGUCCGAAACGGGCACG
UCGGAAACGGUUUUU-3'

【請求項 2】 請求項 1 記載のリボザイムをコードする DNA を含む発現ベクター。

【請求項 3】 請求項 1 記載のリボザイムをコードする DNA を含む発現ベクター DNA を鋳型として、RNA に転写することを特徴とする、請求項 1 記載のリボザイムの製造方法。

【請求項 4】 請求項 1 記載のリボザイムまたは請求項 2 記載の発現ベクターを有効成分として含む医薬組成物。

【請求項 5】 後天性免疫不全症候群を予防および／または治療するための請求項 4 記載の医薬組成物。

【請求項 6】 請求項 1 記載のリボザイムを用いて、標的 RNA を特異的に切断する方法。

【請求項 7】 標的 RNA が HIV-1 RNA である請求項 6 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明はリボザイムおよびその発現系に関する。

【0002】

【従来の技術】

ハンマーヘッドリボザイムは、最も小さい触媒性RNA分子の1つである(Krugerら, 1982; Gruerrier-Takadaら, 1983)。このリボザイムはサイズが小さく、また抗ウイルス剤として可能性があるので、作用機構の研究(DahmおよびUhlenbuech, 1991, Dahmら, 1993; EcksteinおよびLilley, 1996; Pontiusら, 1997; Lottら, 1998; Zhouら, 1996, 1997; ZhouおよびTaira, 1998)およびin vivoにおける利用を目指す研究(EricksonおよびIzant, 1992; Murray, 1992; Rossi, 1995; EcksteinおよびLilley, 1996; Prisleiら, 1997; Turner, 1997; Scanlon, 1997)が多数なされてきた。異なる生物における遺伝子発現抑制のためのリボザイムの使用を目指して成功した実験が多数報告されている(Sarverら, 1990; Drobnicら, 1992; Ojwangら, 1992; Yuら, 1993; ZhaoおよびPick, 1993; Inokuchiら, 1994; Yamadaら, 1994; Ferbeyreら, 1996; Fujitaら, 1997; Kawasakiら, 1998)。しかし、in vitroにおけるリボザイムの効力はin vivoにおける機能的活性と必ずしも相関していない。このin vivoにおける非有効性の理由のいくつかは以下の通りである。i) 細胞性タンパク質がリボザイムの標的RNAへの結合を阻害する、またはリボザイムの活性化コンホメーションを破壊する可能性がある; ii) リボザイムによって媒介される切断にとって不可欠な金属イオンの細胞内濃度が機能的活性に十分でないかもしれない; iii) リボザイムはRNaseによって容易に攻撃される。しかし、リボザイムのin vivo活性を決定するパラメーターが現在解明されつつある(BertrandおよびRossi, 1996; Bertrandら, 1997; Gebhardら, 1997)。in vivoでの研究は、効果的なリボザイム媒介遺伝子不活性化にとって以下の因子が重要であることを示唆した。すなわち、高レベルのリボザイム発現(Yuら, 1993); リボザイムの細胞内安定性(RossiおよびSarver, 1990; EcksteinおよびLilley, 1996); 同一細胞コンパートメント(compartment)内におけるリボザイムとその標的RNAの共局在(SullengerおよびCech, 1993; Bertrandら, 1997); および転写されたリボザイムの切断活性(Thompsonら, 1995)である。最近、これらの種々の特徴は、用いられた発現系に依存することがわかった(Bertrandら, 1997)。

【0003】

mRNA分子の転写のために用いられるRNAポリメラーゼII (pol II)系およびtRNA、snRNA等の小さいRNA分子の転写のために用いられるポリメラーゼIII (pol III)系が、リボザイム発現系として使用されてきた(Turner, 1997)。pol IIプロモーターによって転写が開始された転写物は、コード領域の他に3'末端および5'末端に余分な配列を有する(例えば、非翻訳領域、キャップ構造、およびポリAテイル)。これらの余分な配列はin vivoにおける安定性およびmRNAとしての機能的認識に不可欠である。これらの配列が転写後トリミングされない限り、pol IIプロモーターによって転写が開始されたリボザイム配列を含む転写物は、これらの配列をすべて含んでいる(Tairaら, 1991; Ohkawaら, 1993)。その結果、ある場合には、リボザイムがその標的を認識する部位が、例えばコード配列の一部によって覆われてしまうことがある。対照的に、pol III系は短いRNA分子の発現に適しており、余分な配列は非常に短いものが生成されるのみである。さらに、発現レベルは少なくとも一桁、pol II系のそれよりも高い(CottenおよびBirnstiel, 1989)。したがって、pol III系はリボザイムの発現に非常に有用であろうと示唆された(Yuら, 1993; Perrimanら, 1995)。しかし、多くの場合、pol III系の明らかに望ましい特徴にもかかわらず、リボザイムの期待される効果は達成されなかった(Ilvesら, 1996; Bertrandら, 1997)。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明者らは、pol IIIプロモーターであるtRNA^{Val}プロモーターによって転写が開始される、同一のリボザイム配列を有する3種類のリボザイムを設計し、リボザイムのin vivo活性を決定するパラメーターを検討したところ、転写物(tRNA^{Val}プロモーターの配列が付加されたリボザイム(以下、「tRNA^{Val}-リボザイム」と称する。))の全体的な構造がリボザイムの切断活性ばかりでなく細胞内半減期をも決定することを明らかにした。細胞核において転写されたすべてのキメラtRNA^{Val}-リボザイムは細胞質に輸送され、かくして、リボザイムとその標的は同じ細胞コンパートメント内に存在した。このような条件下

で、本発明者らは各 tRNA^{Val}-リボザイムの細胞内半減期および定常レベルが in vivo における機能的活性の主要な決定要素であることを見いだした。さらに、本発明者らは、in vivo において最長の半減期をもつように特に設計したリボザイムを発現する細胞が HIV-1 の攻撃に対してほぼ完全に耐性であることを示した。

すなわち、本発明は、下記の塩基配列(I) または (II) を持つヌクレオチド配列を含むリボザイムを提供する。

【0005】

塩基配列(I): 5'-ACCGUUGGUUCCGUAGUGUAGUGGUUAUCACGUUCGCCUAACACGCGAAAGGUCC
CCGGUUCGAAACCGGGCACUACAAACACAACACUGAUGAGGACCGAAAGGUCCGAAACGGGCACGUCGGA
ACGGUUUUU-3' (配列番号1)

塩基配列(II): 5'-ACCGUUGGUUCCGUAGUGUAGUGGUUAUCACGUUCGCCUAACACGCGAAAGGUC
CCCGGUUCGAAACCGGGCACUACAAACCAACACACAACUGAUGAGGACCGAAAGGUCCGAAACGGGCACG
UCGGAACCGGUUUUU-3' (配列番号2)

【0006】

また、本発明は、上記のリボザイムをコードする DNA を含む発現ベクターを提供する。

さらに、本発明は、上記のリボザイムをコードする DNA を含む発現ベクター DNA を鋳型として、RNA に転写することを特徴とする、リボザイムの製造方法を提供する。

さらにまた、本発明は、上記のリボザイムまたは発現ベクターを有効成分として含む医薬組成物を提供する。本発明の医薬組成物は、後天性免疫不全症候群を予防および／または治療するのに有効である。

本発明はまた、上記のリボザイムを用いて、標的 RNA を特異的に切断する方法を提供する。標的 RNA としては、HIV-1 RNA が効果的である。

【0007】

【発明の実施の形態】

我々はリボザイムの転写量や安定性、転写後の活性を考慮し、その発現系として、ポリメラーゼ III 系であるヒトの tRNA^{Val} プロモーターを選択し、リボ

ザイムとこのプロモーターとのつなぎ方によって生体内におけるリボザイム効果に差がでないかを検討した。すなわち、生体内において有意なりボザイム効果を得るために重要な要因の一つである、細胞内での安定性、及び転写後の活性に着目し、リボザイムの高次構造とこれらの要因との相関性について明らかにすることを目的とした。

【0008】

まず、HIV-1の比較的保存された配列を標的とするハンマーヘッド型リボザイムを設計し、その遺伝子を様々な配列を介してtRNA^{Val}プロモーターの下流につなぐことにより4種の発現系を構築した。この発現系を構築するためのベクターとしては、pUC19 (Takara)を用いたが、その他にも、pGREEN LANTERN (ライフテックオリエンタル株式会社製)、pHaMDR (HUMAN GENE THERAPY 6:905-915 (July 1995))などのベクターを用いてもよい。また、発現系の構築に必要なオリゴヌクレオチドは、DNA/RNA合成機(モデル394; Applied Biosystems, Division of Perkin Elmer Co. (ABI), Foster City, CA)で化学合成することができる。

【0009】

Zuker法を用いた予測から、tRNA^{Val}プロモーターとハンマーヘッド型リボザイムのつなぎ目の配列の違いはリボザイムの認識部位における2次構造に大きな影響を与えると考えられた(図1参照)。この予測図によると、全体的なりボザイムの2次構造はどれもほぼ同じであるのに対し、基質の結合部位における自由度は大きく異なっていることがわかる。Rz1は基質結合部位の両方が分子内でステム構造を形成しているのに対し、Rz2では片方が、Rz3においては両方の結合部位がきれいにちょうど外側へ突出していることがわかる。Rz3においては突出した基質結合部位がタンパク質に覆われてしまう恐れもあるが、リボザイムはRNA酵素であり、基質との結合しやすさが、解離のしやすさと同時に活性における重要な因子となるため、リボザイムの切断能力としてはこれが一番であることが予測された。実際、細胞内において転写されたりボザイムを用いてin vitroの系において[40mM Tris-Cl (pH8.0), 8mM MgCl₂, 5mM DTT, 2mM Spermiidine, 2 U/ μ l RNase inhibitor, 30 μ g total RNA]の条件下で反応を

行った。この際total RNA中に含まれるリボザイムの含有量は一定に揃えた。In vitroで転写し、放射ラベルした短い基質に対するリボザイムの活性はその認識部位における自由度に依存する結果となった(図2参照)。また、リボザイムの安定性についても検討した。対照となる遺伝子の発現量を一定に揃え、それぞれのリボザイム量を比較検討した。リボザイムの構造における違いは安定性にも影響を与えており、“なぜ全体的にはそれほど差のない構造がこのような影響するのか”理由は明らかではないが、最も安定なものとそうでないものは約25倍もの差を示した(図3B参照)。

【0010】

先にも述べたように、いまだ不明であるin vitroの系におけるリボザイムの活性と生体内における効果との相関性についても次に検討した。まず、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を用い、これとpNL4-3(HIV-1のクローン)の配列の融合遺伝子に対してリボザイムを作用させ、細胞抽出液内のルシフェラーゼ活性を測定することで間接的に細胞内におけるリボザイム効果を評価する系を構築した(図3A参照)。それぞれのリボザイムについて比較して結果、細胞内で安定性の最も高かったものが最も高活性を示したことから、安定性がいかに重要であるかが示唆された(図4参照)。

【0011】

ここまでの話は培養細胞内においてルシフェラーゼ遺伝子とHIV-1の配列との人工的な融合遺伝子に対するリボザイム効果の評価となるので、結局のところ、実際の生体内における結果と等しいと判断することは困難である。そこで、実際のHIV-1に対するリボザイム効果の評価を行った(図5参照)。リボザイム発現系の形質転換体にHIV-1を感染させ、ウイルスの増殖を血清中におけるp24(ウイルスのコアタンパク)の生産量を測定したところ、我々の培養細胞内における評価と同様な傾向を示す結果が得られた。またin vitroで最も安定性の高かったリボザイムはこの場合においても非常に高い抑制効果を示し、p24の生産を99%抑えていることが明らかとなった(図6C参照)。一方、in vitroで切断活性の最も高かったリボザイム発現系はウイルスの増殖をほとんど抑制することができなかった。

【0012】

このように、ウイルスでのリボザイム効果の評価も培養細胞内における人工的な基質における評価と同傾向を示していることが明らかになった。よって、今回我々が行ったような一過的な評価における結果も、生体内におけるリボザイム効果のおおよその目安になると考えられる。またin vitroからウイルスを扱った実験にわたる結果から、リボザイムの細胞内における有意な効果を得るためには活性の高さも大事であるが、それにも増して細胞内における安定性が重要であることが明らかとなった。今回のようにほとんど配列に違いのないリボザイムにおいても、発現系とのつなぎ方一つで、先に述べたような生体内における効果に大きな差が生じるという事実は、これについても十分考慮する必要がある、また発現させるために付加した配列による高次構造の影響も加味し、リボザイムに安定性を持たせるような設計が重要であることが示唆された。

【0013】

本発明のtRNA^{val}-リボザイムを用いて、標的RNA、特にHIV-1 RNAを特異的に切断することができる。

本発明のtRNA^{val}-リボザイムは、医薬、特に、後天性免疫不全症候群を予防および／または治療するための医薬として使用することができる。例えば、本発明のtRNA^{val}-リボザイムをリボソームに封入し、これを生体に投与して、HIVを含む細胞に取り込ませることにより、HIVの転写を阻害することができる。また、本発明のtRNA^{val}-リボザイムをコードするDNAをウイルスなどのベクターに組み込んで、HIVを含む細胞内に導入し、該細胞内でこのベクターを発現させ、本発明のtRNA^{val}-リボザイムを産生させることにより、HIVの転写を阻害することができる。本発明のtRNA^{val}-リボザイムの投与は、疾病の状態の重篤度や生体の応答性などによるが、予防および／または治療の有効性が認められるまで、あるいは疾病状態の軽減が達成されるまでの期間にわたり、適当な用量、投与方法、頻度で行えばよい。

【0014】

【実施例】

本発明を以下の実施例によりさらに具体的に説明する。本発明の範囲は、これ

らの実施例に限定されることはない。

[実施例]

材料および方法

プラスミドの構築

各 tRNA^{Val}-リボザイムを発現するプラスミド (pUCdt-Rzシリーズ) は以下のように構築した。すなわち、ヒト胎盤 tRNA^{Val} 遺伝子 (pHtV1; Arnoldら, 1986) に由来するプロモーター領域の配列をコードするセンスおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドリンカーをアニールし、pUC19のEcoRI/SalI部位に連結した。オリゴヌクレオチドリンカーの配列は以下の通りであった：センス 5'-aat tca gga cta gtc ttt tag gtc aaa aag aag aag ctt tgt aac cgt tgg ttt ccg tag tgt agt ggt tat cac gtt cgc cta aca cgc gaa agg tcc ccg gtt cga ag-3' (配列番号6)；アンチセンス 5'-tcg act tcg aac cgg gga cct ttc gcg tg t tag gcg aac gtg ata acc act aca cta cgg aaa cca acg gtt aca aag ctt c tt ctt ctt ttt gac cta aaa gac tag tcc tg-3' (配列番号7)。次に、ターミネーター配列をコードするセンスおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドリンカーをアニールし、プロモーター領域の配列を含むpUC19のNspV/SalI 部位に連結した。オリゴヌクレオチドリンカーの配列は以下の通りであった：センス 5'-cg a aac cgg gca ccc ggg gaa tat aac ctc gag cgc ttt ttt tct atc gcg tc-3' (配列番号8)；アンチセンス 5'-tcg acg cga tag aaa aaa agc gct cga ggt tat att ccc cgg gtg ccc ggt ttc-3' (配列番号9)。得られたプラスミド (これは tRNA^{Val} のAおよびBボックス、ならびにターミネーターを含んでいた) をpUCdtと名付けた。

【0015】

pUCdtを鋳型とし、アッパープライマー (5'-cgc cag ggt ttc cca gtc acg ac-3') (配列番号10) およびリボザイムとターミネーター両方の配列を含むロアプライマー (Rz1、5'-ctg cag gtc gac gcg ata gaa aaa aag cgc tcg agg tgc ccg ttt cgt cct cac gga ctc atc agt gtt gtg tgg gtg ccc ggt ttc ga a ccg gga cct tt-3' (配列番号11)；Rz2、5'-ctg cag gtc gac gcg ata gaa aaa aac cgt ttc cga cgt gcc cgt ttc ggt cct ttc ggt cct cat cag tg

t tgt gtt tgt agt gcc cgg ttt cga acc ggg gac ctt t-3' (配列番号 12) ;
R z 3、5'-ctg cag gtc gac gcg ata gaa aaa aac cgt ttc cga cgt gcc cgt t
tc ggt cct cat cag tgt tgt gtg ttg gtt tgt agt gcc cgg ttt cga acc ggg
gac ctt t-3' (配列番号 13) を用いて、各リボザイムおよび tRNA^{Val} 部分
の配列をコードする DNA 断片を PCR によって増幅した。PCR 産物を EcoRI
および SalI で消化した後、各断片を pUC19 の EcoRI/SalI 部位に連結し、pUCdt-Rz
を得た。pUCdt および pUCdt-Rz シリーズの配列を直接ヌクレオチド配列決定によ
って確認した。tRNA^{Val}-リボザイム遺伝子に加え参照遺伝子発現カセットを
も含む pUC-Rr シリーズのメンバー (図 3 A 参照) は、pUCdt の PvuII 断片を各 p
UCdt-Rz の HincII 部位に挿入することによって構築した。制限酵素による消化に
よって挿入断片の方向を確認した。リボザイム導入 HeLa 細胞の作製に用いた pHyg
dt-Rz シリーズは、pUCdt-Rz シリーズの各 PvuII-SalI 断片を pHyg (Yates ら, 198
4) の EcoRV/SalI 部位に挿入することによって構築した。オリゴヌクレオチドリン
カーおよび PCR プライマーのすべては、DNA/RNA 合成機 (392 型; PE Ap
plied Biosystems, Foster 市, CA) を用いて合成した。

【0016】

組換え HIV ベクタープラスミドは以下のように構築した。すなわち、pMC1 neo
由来の細菌性 neo^r 遺伝子カセットをコードする 2.0 kbp の BamHI 断片 (Thomas お
よび Capecchi, 1987) を、HIV-1 由来ベクターの SalI 部位に挿入した (図 5 A ; Sh
imada ら, 1991)。次に、図 5 B に示すように、tRNA^{Val}-リボザイム発現カセ
ットを TK-neo^r のすぐ上流で SalI 部位にクローン化した。

【0017】

細胞の培養およびトランスフェクション

HeLa および Cos 細胞は、10% (v/v) ウシ胎児血清 (FBS; Gibco BRL) および 45 μ g
/ml ゲンタマイシン (Gibco BRL) を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM; G
ibco BRL, Gaithersburg, MD) で培養した。リボザイム導入細胞を選択するため
、ハイグロマイシン B を最終濃度 300 μ g/ml で用いた。H9 細胞は、10% ウシ胎
児血清 (FCS; Gibco BRL) を添加した RPMI (Gibco BRL) で培養した。

【0018】

リポフェクチン試薬(Gibco BRL)を製造者のプロトコールにしたがって用いて、細胞をトランスフェクトした。H9細胞のトランスフェクションは、組換えHIV-1ベクタープラスミド(図5BのHIVRib.N)を用いてCaPO₄共沈殿法により実施した。

【0019】

RNAの調製

グアニジニウムチオシアネートフェノールクロロホルム法により全RNAを抽出した。細胞質RNAおよび核RNAを文献(HuangおよびCarmichael, 1996)に記述された通り分離した。

【0020】

リボザイムの定常レベルおよび半減期の測定

各リボザイムの定常レベルの測定は以下のように実施した。すなわち、各pUC-Rrを用いてHeLa細胞(1×10⁶細胞/10 cmプレート)をトランスフェクトした。トランスフェクションの2日後に、これらの細胞から全RNAを単離した。単離された全RNAのtRNA^{Val}-リボザイムの下流に位置する対照RNAの量を、対照RNAに特異的なプローブ(5'-aaa tcg cta taa aaa gcg ctc gag gtt atg ctc ccc ggg t-3') (配列番号14)を用いたノーザンブロット分析でまず定量した。各サンプル中の対照RNAの量を一定値に維持した。また、全RNAのレベルも、必要であればトランスフェクトされていないHeLa細胞から単離したRNAを添加することにより一定に保った。最後に、リボザイムに特異的なプローブ(5'-ctc atc tgt gtt gtg t-3') (配列番号15)または対照RNAに特異的なプローブを用いてハイブリダイゼーションを繰り返した(図3B)。

【0021】

各リボザイムの半減期は、細胞を文献(HuangおよびCarmichael, 1996)に記述された通りアクチノマイシンDで処理した後、ノーザンブロット分析によって測定した。すなわち、細胞をアクチノマイシンDに最終濃度5 μl/mlで0、60、120または180分間さらし、各時点で全RNAを単離した(図3C)。単離されたRNAの各調製物中のリボザイムの量をノーザンブロット分析により測定した。

【0022】

切断アッセイ

各pUCdt-RzまたはpUCdt によってトランスフェクトされたHeLa細胞から全RNAを抽出した。単離されたRNAの各調製物中のリボザイムの量を、リボザイムに特異的なプローブを用いたノーザンブロッティングにより測定した。次に、トランスフェクトされていないHeLa細胞から単離したRNAを添加することにより各リボザイムの濃度を同じ値になるように調節した。HIV-1のU5 LTR領域をコードする基質RNA (図2A) をT7転写によって調製し、 ^{32}P を用いて放射標識した。50 μl の反応混合物[40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 8 mM MgCl_2 , 5 mM ジチオトレイトール (DTT), 2 mM スペルミジン、40 Uの胎盤RNaseインヒビター、30 μl の全RNA、5 kpcの放射標識した基質RNA] 中で37°Cで12時間切断反応を進行させた。6%ポリアクリルアミド/7 M尿素ゲルを用いた電気泳動にかけて反応生成物を同定した (図2B)。

【0023】

ルシフェラーゼアッセイ

Dual-LuciferaseTM Reporter Assay System (Promega, Madison, WI)を製造者のプロトコールにしたがって用いて、ルシフェラーゼ活性を測定した。pUCdt-Rzおよび標的発現プラスミドによってトランスフェクトされたHeLa細胞 (図4A)、または標的発現プラスミドによって形質導入されたりボザイム産生HeLa細胞 (図4B) を150 μl の 1x 受動溶解緩衝液中で15分間溶解し、プレートからこすり取った。遠心分離によって細胞破砕物を除去した。20 μl の遠心分離した溶解物を100 μl のルシフェラーゼアッセイ試薬IIに添加した後、発光計(luminometer) (Luminant LB 9501; Berthold, Bad Wildbad, Germany)を用いて発光シグナルを直ちに定量化した。さらに、ホタルルシフェラーゼの活性を標準化するため、我々はホタルルシフェラーゼによって触媒された反応の定量化の直後に100 μl のStop & GloTM試薬をサンプルチューブに加えることによって、ウミシイタケ(Renilla)ルシフェラーゼによって生成された発光シグナルを測定した。ウミシイタケルシフェラーゼの活性を参照して、ホタルルシフェラーゼ活性の記録された数値を標準化した (図4)。

ホタルルシフェラーゼ活性の標準化した各数値を、溶解物中のタンパク質濃度を参照してさらに標準化した。タンパク質はブラドフォード法(Bradford's method)に基づくProtein Assay Kit (Bio-Rad, California, USA)を用いて定量した。

【0024】

リボザイムを安定に導入されたHeLa細胞

pHyg dtまたはpHyg dt-Rzシリーズのメンバーを用いてHeLa細胞をトランスフェクトし、300 $\mu\text{g/ml}$ のハイグロマイシンB (和光純薬、大阪、日本)を含有するDMEM中で選択することにより、リボザイム導入細胞を得た。トランスフェクションの12時間後に培地を増殖培地と交換し、細胞をさらに48時間培養した。細胞を1:5の希釈で、300 $\mu\text{g/ml}$ のハイグロマイシンBを含有するDMEM(選択培地)で継代培養した。培地は3日ごとに新鮮な培地と交換した。ハイグロマイシンBに耐性な細胞を、250 $\mu\text{g/ml}$ のハイグロマイシンBを含有するDMEM中で増殖させた。

【0025】

ウイルスの作製およびHIV ベクターによるリボザイムの導入

組換えウイルスを含む上清を文献 (Shimada, 1991)に記述されるように作製した。すなわち、Cos細胞(2×10^6 細胞/10 cmの皿)を培養し、10 μg のパッケージングベクタープラスミドおよび10 μg の組換えHIV ベクタープラスミド(図5Bに示すHIVRib.N)を用いてトランスフェクトした。48時間後に組換えウイルスを含む上清を採取し、孔径0.22 μm のフィルターで濾過した。次に、 2×10^6 個のH9細胞を、6 $\mu\text{g/ml}$ のPolybreneTM (Abbott Laboratories)を含む濾過した上清5 mlと共にインキュベートした。24時間後、培地を10%FCSおよび1 mg/ml G418を添加したRPMIと交換した。細胞をさらに48時間培養し、G418耐性クローンを単離した。RT-PCR分析によってリボザイム遺伝子の導入を確認した。

【0026】

H9細胞中に産生されたtRNA^{Val}-リボザイムの定量

以下のように定量的RT-PCRを実施した(Ozawaら, 1990; HambletおよびCastora, 1995)。すなわち、リボザイムを安定に導入したH9細胞から全RNAを抽出

した。20 μ l の反応混合物 [1 μ g の全RNA、20 mM Tris-HCl (pH 8.3)、50 mM KCl、5 mM MgCl₂、1 mM dNTP、1 pmolのプライマー (β アクチン用: 5'-gtg gcc atc tct tgc tcg aa-3' (配列番号16); リボザイム用: 5'-gac ctt tcg gtc ctc atc-3' (配列番号17)) および0.25 U/ml モロニーマウス白血病ウイルスRTase (宝酒造、京都、日本)] 中で42℃で30分間 cDNA を合成した。

【0027】

2個のオリゴヌクレオチドプライマー (アッパー: 5'-gac tac ctc atg aag a tc ct-3' (配列番号18); ロアー: 5'-gtg gcc atc tct tgc tcg aa-3' (配列番号19)) を用いたPCRにより β アクチンの cDNA を増幅した。PCR サイクルは、94℃ 1分間、60℃ 1分間および72℃ 2分間を13、15または17サイクル実施した。2個のオリゴヌクレオチドプライマー (アッパー: 5'-gtt atc acg t tc gcc taa-3' (配列番号20); ロアー: 5'-gac ctt tcg gtc ctc atc-3' (配列番号21)) を用いたPCRによりリボザイム cDNA を増幅した。PCR サイクルは、94℃ 1分間、55℃ 1分間および72℃ 2分間を13、15または17サイクル実施した。

【0028】

13、15および17サイクル後のPCR産物を、リボザイムに特異的(5'-acg cga aag gtc ccc ggt-3' (配列番号22)) または β アクチンに特異的(5'-gcg gga aaa tcg tgc gtg a-3' (配列番号23)) な放射標識プローブを用いたサザンブロッティングにより分析した。BAS2000 システム (富士フイルム、東京、日本) を用いて各バンドの放射能 (図6Aおよび6B) を測定した。

【0029】

HIV-1チャレンジアッセイ

HIV ベクター (HIVRib.N) を用いてリボザイムを導入したH9細胞およびモックを導入した対照細胞をNL432 と共にm.o.i (感染多重度) 0.01で4時間インキュベートした。PBS で2回洗浄した後、これらの細胞を 1×10^5 細胞/mlの密度で、10% FCS を添加したRPMI 1640培地で培養した。ウイルス感染後3、7および14日目に上清を回収した。HIV-1抗原捕獲ELISA テストキット (DAINABOT、東京、日本) を製造者の指示にしたがって用いて、各上清におけるHIV-1のp24 抗原の

レベルを測定した。

【0030】

結果

tRNA^{Val}-リボザイムの二次構造およびin vitroにおけるそれらの切断活性

pol IIIによって転写が開始されるリボザイム発現カセットを構築するため、我々はHIV-1 RNAの5' リーダー配列を標的とするリボザイム配列 (Adachiら, 1986; Yuら, 1993)を、間に3つの短いリンカーを介して、tRNA^{Val}プロモーターに隣接してクローン化し (図1においてリンカー配列は小文字で、またリボザイム配列は太い大文字で示す)、一組のpUCdt-Rzプラスミドを得た。短いリンカーの挿入は、転写物の全体的構造を変化させ、その結果、リボザイムの認識アーム (arm) (図中、認識アームには下線を付してある) の接近しやすさ (accessibility) に影響を及ぼした。当然ながら、リボザイムが基質RNAと共にステム (stem) 構造 (これは次におこる基質の切断を確実にするものである) を形成できるように、リボザイムの5' 側および3' 側基質認識部位の両方が基質に対して利用可能であることが重要である。構造と機能的活性の関係を明らかにするため、我々は認識アームの利用可能性 (availability) の程度を変更するリンカーを選択した。図1はコンピュータモデリング (Molfold Biocomputing Office, Biology Department, Indiana University, IN, USA) によって予測されるtRNA^{Val}-リボザイムの二次構造 (AおよびBボックスに対応する配列に影をつけてある) を示す。ある場合においては (図1A)、ターミネーター配列の前にリンカーが挿入され、リボザイムの3' 側基質認識アームのフレキシビリティを制限した。さらに、5' 側基質認識アームは利用不可能であった。したがってtRNA^{Val}-リボザイム1 (図1AのRz1) の場合は、5' 側および3' 側基質認識アームの両方は殆どらせん構造中に埋没していた。tRNA^{Val}-リボザイム2 (Rz2) は、5' 側に制限された1つの基質認識アームを有する。対照的に、tRNA^{Val}-リボザイム3 (Rz3) は制限された基質認識アームを全くもたず、両方のアームとも基質との結合に利用可能であった。基質認識アームのフレキシビリティから判断すると、Rz3の切断活性が最も高く、次にRz2およびRz1がこの順番で続くと予想されよう。なお、Rz1~3の塩基配列は、それぞれ

、配列表の配列番号3、1、および2に示す。

【0031】

上記リボザイムがそれらの二次構造(図1)から予想される通りの切断活性を有するかどうかを調べるため、我々はまずin vitroにおける活性を比較した。上記リボザイム($tRNA^{Val}$ -リボザイム)をコードする種々のpUCdt-Rzプラスミドを用いてトランスフェクトしたHeLa細胞から全RNAを単離した。我々は単離したRNA中の各リボザイムの一定量(ノーザンブロット分析データに基づく)を放射標識した基質RNAと混合し、切断反応を開始させた。12時間インキュベートした後、6%ポリアクリルアミド/7 M尿素を含むゲルを用いて各反応の進行をモニターした(図2)。予想した通り、両方の認識アームが利用可能であるRz3の切断活性が最も高く、次にRz2が続き、他方、両方の認識アームが利用できないRz1の切断活性は非常に低かった。したがって、in vitroにおける $tRNA^{Val}$ -リボザイムの切断活性は、コンピュータによって作製されたそれらの二次構造から推定できることが明らかであった。

【0032】

$tRNA^{Val}$ -リボザイムの定常レベルおよび半減期

我々はリンカー配列の介在によって全体的な構造に小さい変化が生じるであろうと予想した。したがって、リンカーはリボザイムのin vivoにおける安定性にかなりの影響を及ぼすに相違ない。我々は2つの異なるアプローチを用いて、各 $tRNA^{Val}$ -リボザイムの細胞内安定性を下記のように比較した。すなわち、pUC-Rr(リボザイムをコードする各pUCdt-Rzプラスミドに参照遺伝子の配列を付加してpUC-Rrを作製した;図3A)を用いて一過性にトランスフェクトしたHeLa細胞由来の各転写物の定常レベルをノーザンブロット分析(一過性発現アッセイ)により比較した。参照遺伝子の転写量を調整することにより各 $tRNA^{Val}$ -リボザイムの発現レベルを標準化した。参照遺伝子は同じプラスミド内にタンデムに連結した(pUC-Rr;図3A)。 $tRNA^{Val}$ -リボザイムをコードする各プラスミドを用いてトランスフェクトしたHeLa細胞から我々が単離したRNAの全サンプル中に、長さが約150ヌクレオチド(これはキメラ $tRNA^{Val}$ -リボザイムの大きさと一致する)の転写物が検出された。 $tRNA^{Val}$ -リボザイムの定常レベル

は、濃度が30倍の範囲で異なっていた。最も高かったRz2のレベルは最も低いRz1のレベルの約26倍であった。そして、Rz3のレベルはRz1のレベルの約5倍であった。各リボザイム発現カセットのプロモーター領域には何の改変もしていないので各場合において転写効率は同一であると推定されるため、我々は転写物の定常レベルにおけるこれらの差は各転写物のin vivoにおける安定性の結果であると仮定した。

【0033】

第2のアプローチとして、また上記の仮説を試験するため、我々はより自然な細胞内条件下で各転写物の安定性を比較しようと試みた。我々は、各tRNA^{Val}₁-リボザイムを産生する安定したHeLa形質転換細胞を確立し、そしてアクチノマイシンDを用いて細胞性転写を妨げることによって各転写物の細胞内半減期を直接測定した。図3Cに示すように、Rz2の分解速度はRz1およびRz3のそれよりも低かった。Rz2の半減期(100±10分)は、Rz1(35±2分)およびRz3(40±15分)の2倍以上であった。これらの結果は一過性発現アッセイの結果と良く一致しており、転写物の定常レベルにおける差は転写効率における何らかの差によるよりも、むしろ各転写物のin vivoにおける安定性による、という我々の仮説を支持した。

【0034】

tRNA^{Val}-リボザイムの細胞内活性

tRNA^{Val}-リボザイムの細胞内活性を評価するため、我々は2種類のアッセイを実施した。第1に、各tRNA^{Val}-リボザイム発現プラスミド(pUCdt-Rz)およびHIV-1 LTR (R-U5 領域)-ルシフェラーゼからなるキメラ遺伝子をコードする標的遺伝子発現プラスミドを用いてHeLa細胞を同時トランスフェクションした。両遺伝子の一過性発現の後、各細胞溶解物においてルシフェラーゼ活性を測定することにより各tRNA^{Val}-リボザイムの細胞内活性を評価した。リボザイム発現プラスミドの代わりに最小限のtRNA^{Val}プロモーターおよびターミネーター配列を有する対照プラスミド(pUCdt)を用いた場合に記録されたルシフェラーゼ活性を100%とした。図4Aに示すように、in vivoにおいて安定性が最も高かったRz2が最も効果的(>60%抑制)であり、Rz3が次に効果的(>40%抑制)

）であった。R z 1 は、in vitroにおける低い切断活性（図 2 B）およびin vivoにおける低い安定性（図 3 B および 3 C）から予測されるように、非常に効果的とは言えなかった（約10% 抑制）。

【0035】

第2のアッセイにおいては、標的遺伝子発現プラスミドのみを用いて、ほぼ同一レベルのtRNA^{Val}-リボザイムを発現する安定した形質転換細胞をトランスフェクトした（安定した形質転換HeLa細胞を恣意的にピックアップし、リボザイムをほぼ同一レベルで発現するクローンを試験用を選択した）。各リボザイムに対して2つの独立した、安定な形質転換体を用いたこの実験において（図 4 B）、我々は上の段落に記述した傾向に類似した傾向を観察した。しかし、この場合は、おそらく形質転換HeLa細胞がtRNA^{Val}-リボザイムを構成的に産生したため、すべてのリボザイムの効果はより強かった。R z 2 は標的遺伝子の発現を有意なレベルまで抑制し、ある場合には97%も抑制した。

【0036】

R z 3 はin vitroにおける切断活性が最も高かったが、細胞環境内ではR z 2 より効果的に作用することはなかった。これらの結果は、もし転写されたリボザイムが細胞内で十分安定であるならば、極めて高い切断活性がなくてもin vivoにおいて顕著な効果をもたらすことを示唆する。

【0037】

HIV-1の複製を抑制する能力

上記の試験は、R z 2 およびR z 3 がin vivoにおいてHIV-1の配列に対して有意な切断活性をもつかも示したので、我々はHIV-1の複製を抑制するtRNA^{Val}-リボザイムの能力を比較した。すなわち、HIVベクター（図5；Shimadaら, 1991）を用いて、R z 2 またはR z 3 を発現するH9細胞系の安定な形質転換体を得た（上記の試験においてR z 1 は不活性だったので、R z 1 を産生する安定な形質転換体を単離する試みは行なわなかった）。HIVベクターによって形質導入された、リボザイム発現カセットをもたない細胞（図 5 A）をモック対照として用いた。以下の分析には2つの独立した細胞系を用いた。その結果、11日間にわたって、リボザイムを産生しない細胞の増殖速度（データはここ

に示していない)と較べ、それら細胞系の増殖速度に何ら明白な変化は検出されなかった。したがってリボザイムは宿主細胞にとって有害ではなく、おそらく高い特異性をもって標的RNAのみを切断したのであろう(Kawasakiら, 1996, 1998)。

【0038】

ウイルスチャレンジアッセイに先立って、我々は定量的RT-PCR分析により形質導入H9細胞における各tRNA^{Val}-リボザイムの定常レベルを測定した。図3Bに示すHeLa細胞を用いた一過性発現アッセイの結果、すなわち、Rz2とRz3の定常レベルの差は約5倍であるということが、RT-PCR分析により確認された(図6Aおよび6B)。明らかにRz2は*in vivo*においてRz3よりも安定であった。

【0039】

tRNA^{Val}-リボザイムを構成的に産生する安定なH9形質転換体をHIV-1ピリオンを用いてチャレンジし、感染の11日後に測定するとRz2は殆ど完全にウイルスの複製を抑制した(約99%)(図6C)。対照的に、驚くべきことに、Rz3はこれらの実験条件下でウイルスの複製を全く抑制しなかった。HIV-1チャレンジアッセイにおいては、Rz2とRz3の効果の差は顕著であった。

【0040】

tRNA^{Val}-リボザイムの細胞内局在

リボザイムがその標的と共局在することがリボザイム効果の明らかに重要な決定要素であるので(SullengerおよびCech, 1993; Bertrandら, 1997)、tRNA^{Val}-リボザイムの細胞内局在を確認することが不可欠であった。Rz2発現カセットによって形質導入されたHeLa細胞由来の全RNAを核画分および細胞質画分に分離した。次に、リボザイムに特異的なプローブを用いてノーザンブロット分析により転写されたRz2を検出した。図7Aに示すように、Rz2は主として細胞質画分に見いだされた。そして、核画分では有意なレベルで検出されなかった。他のtRNA^{Val}-リボザイム(Rz1およびRz3)もまた細胞質画分に主として局在していた(データはここに示していない)。核内に残留するU6 snRNAは対照としてこれらの試験に含めた(図7B)。

【0041】

考察

リボザイムは特定の遺伝子の発現を抑制するための、可能性のある有用な道具である。なぜなら、リボザイムは高い特異性をもって他のRNA分子に作用するように作製できるからである (Uhlenbeck, 1987; HasseloffおよびGerlach, 1988)。多数の試みが成功をおさめたが (EcksteinおよびLilley, 1996; Turner, 1997; Scalon, 1997)、in vivoにおいて使用できる効果的なリボザイム発現系を設計することは依然として困難である。治療剤または遺伝子的作用物質としてのリボザイムおよびアンチセンスRNAの使用に関連する1つの主要な挑戦は、適切な発現ベクターの開発である (JenningsおよびMolloy, 1987; Sullengerら, 1990; Bertrandら, 1994, 1997; Thompsonら, 1995)。序論に述べたように、今日まで2種類の発現系、すなわちpol II系およびpol III系が用いられてきた。本研究において、我々はpol III系およびリボザイムの転写のためにヒトtRNA^{Val}遺伝子のプロモーター (Yuら, 1993)を用いた。このプロモーターは小さいRNA分子の転写に適しているばかりでなく、その使用はコンピュータフォールディング (folding)による二次構造の予測を容易にする。より重要なことに、それは転写されたりボザイムの核から細胞質への輸送を可能とし、その結果tRNA^{Val}-リボザイムは標的mRNAを見つけることができるのである。

【0042】

発現カセットの設計

標的mRNAの二次構造は、リボザイムによって媒介される切断を受けやすいかどうかを決定する。そして、リボザイムもまた最大活性を得るためには適切な二次および三次構造に折り畳まれなければならない。コンピュータが予測する二次構造が転写後の対応する構造を本当に表しているという保証は全くないが、本研究において予測された構造 (図1A~1C)は、in vitroにおける切断活性と良く相関していた (図2)。発現カセットにおいては、転写物の3'末端プロセシングをブロックするため、成熟tRNA^{Val} (図1Eに大文字で示す)の最後の7個の塩基が除去されたが転写に何ら影響はなかった (Adeniyi-Jonesら, 1984)。これらの塩基をリンカー (図1に小文字で示す)によって置換し、その後

リボザイム（太い大文字）を続けた。リンカー配列によって $tRNA^{Val}$ の配列（全配列の約 $2/3$ をしめた）と組み合わせて安定なステム構造を形成することにより、基質認識アームの自由度または利用可能性を調節した。したがって、コンピュータフォールディングによって各認識アームの二次構造および接近可能性を予測することは比較的容易であった。さらに、基質認識アームの配列が変わっても、全体的二次構造を予測する同じルールを用いる限り、認識アームの接近可能性を予測することは可能である。実際、我々は他の遺伝子の発現を抑制するための類似のリボザイム発現系の構築に成功した（Kawasakiら, 1996, 1998）。図1 A～1 Cに示す我々の発現系は、効果的なリボザイム発現カセットの設計を容易にする。

【0043】

$tRNA^{Val}$ -リボザイムの核から細胞質への輸送

図1 A～1 Cに示すリボザイム発現カセットは、すべての転写物が細胞質（ここで転写物はその標的を見いだすことができる）に輸送されるのを可能とした（図7 A）。そして、リボザイムによる標的分子の発現の有意な抑制が観察された（図4 および6 C）。以前の研究（Bertrandら, 1997）において、成熟 $tRNA^{Met}$ の最後の10塩基の欠失は3'末端プロセッシングをブロックしただけでなく、転写物の細胞質への輸送を阻害した（Tobianら, 1985）。これらの結果は、3'末端プロセッシングが細胞質への輸送と結びついている可能性があること、および3'末端が変更された転写物は効率的に輸送されないことを示唆した（CottenおよびBirnstiel, 1989; Boelensら, 1995）。しかし、図7に示されるように、成熟 $tRNA^{Val}$ の最後の7塩基の欠失は、転写物の核からの輸送を抑制しなかった。

【0044】

$tRNA$ を核から細胞質へ輸送するExportin(tRNA)と称するタンパク質が最近同定された（Artsら, 1998）。Exportin(tRNA)は $tRNA$ の不在下でRanGTPと結合する。しかし、これはRanGTPの不在下では $tRNA$ と結合しない。したがって、下記の $tRNA$ 輸送モデルが提案された。すなわち、まず核内でExportin(tRNA)がRanGTPと会合し、次にこの複合体が成熟した $tRNA$ に結合するというもので

ある。この最終的な複合体は、核膜孔複合体をへて細胞質に運ばれる。そこでRan結合GTPは加水分解されてtRNAを細胞質中に放出し、Exportin(tRNA)を核にもどしてリサイクルさせる(Artsら, 1998)。Exportin(tRNA)によって認識されるtRNA中の最小配列または構造はいまだに分かっていない。しかし、図1A～1Cに示すリボザイムは細胞質にうまく輸送されたので、天然のtRNAの3'末端における欠失および変更にもかかわらず、これらリボザイムがExportin(tRNA)によって認識され、輸送されたということが考えられる。

【0045】

我々の研究から、3'末端変更tRNA転写物はその二次構造が図1A～1Cに示すものと類似しているならば、細胞質へ効率的に輸送されうることが明らかである。別の種類のリボザイム(図1DのRz4(配列番号5))をHeLa細胞で発現させようと同様の実験を行なった際、転写物は核内に残った(図7C)。転写物Rz1～Rz4においてはAおよびBボックスプロモーターエレメント(図1の影をつけてある部分)のみならず、tRNA^{Val}セグメント内の残りのすべての配列が同一であるという事実にもかかわらず、Rz4(図1D)の二次構造は細胞質リボザイムRz1、Rz2およびRz3のそれと全く異なっている。この観察は、もしExportin(tRNA)が実際にリボザイム転写物を認識できるのであれば、Exportin(tRNA)は特定のヌクレオチド配列を認識するのではなさそうだと、いうことを示唆する。Exportin(tRNA)はむしろtRNAの何らかの特異的高次構造、またはそのような高次構造内の何らかの配列を認識するのかもしれない。

【0046】

実際、別の目的のために構築した、二次構造がRz4のそれと類似している別のリボザイムは核内にのみ見いだされた(データは示していない)。我々は別の3種類の遺伝子を抑制するために、10種類以上の別のリボザイムを構築した。構築にあたっては、それらが細胞質へ輸送されるように、二次構造を図1のRz1からRz3の二次構造に似たものにしようと留意し、リンカー配列を調節した。これらのリボザイムのすべては、転写後、細胞質中に見いだされた。これらは高い活性(>95%抑制)のみならず、高い特異性(不活性対照による抑制は<5%)をも有していた。したがって、図1A～1Cに示す設計に基づく細胞質リボザイ

ムは非常に魅力的に思われる(Kawasakiら, 1996, 1998)。核内に残留し、活性がそれほど高くなかった Rossiの tRNA^{Met}-リボザイム(Bertrandら, 1997)は、リンカー配列が異なっているため、我々の活性な二次構造とは類似していないということも述べておくべきであろう。それらの構造は Rz 4 のそれに類似している(コンピュータによって予測された構造はここには示していない)。

【0047】

Rz 4 または Rossiの tRNA^{Met}-リボザイムのようなものではなく Rz 1 から Rz 3 のようなリボザイムが RanGTP の存在下で(すなわち、輸送受容体とその貨物の間で複合体の形成が予想されるような条件下で)、Exportin(tRNA)と複合体を形成するかどうかを決定することは興味深いであろう(Artsら, 1998)。

【0048】

in vivoにおける tRNA^{Val}-リボザイムの活性

SullengerおよびCech (1993) ならびにRossiのグループ(Bertrandら, 1997)は、リボザイムのその標的の細胞内共局在の重要性を明確に示した。1つの特定の発現カセットの場合、リボザイムとその標的RNAの両方が核内に見いだされ、そしてリボザイムによる標的の特異的切断が検出された(Bertrandら, 1994)。したがって、決定的なパラメーターはリボザイム自体の局在ではなく、むしろ標的と共局在するリボザイムの能力である(Bertrandら, 1997)。mRNAの細胞内プロセッシングおよび輸送には種々のタンパク質性因子が関与しているので、そしてそのような因子は転写直後にmRNAと迅速に結合しうるので、このような因子は核内におけるリボザイムの標的RNAとの結合を阻害しうるのである。また細胞質中においても、ポリソームがリボザイムの標的RNAとの結合を阻害するかもしれない。さらに、核 tRNA^{Met}-リボザイムは、もとは核内で産生された細胞質 mRNA を不活性化しなかったため(Bertrandら, 1997)、核から細胞質への mRNA の輸送は核 tRNA^{Met}-リボザイムによる攻撃よりもはるかに迅速であるように思われる。in vivoにおけるリボザイムの活性を決定する最も重要な因子の1つは、リボザイムとその標的との会合であると思われる。リボザイムの相当多くの部分が輸送中および標的部位への接近中に分解されるに違いない。このため、リボザイムとその標的が共局在していても、それだけではリボザイムの in

vivoにおける効果を保証しない。

【0049】

in vivoにおいて最も安定であったリボザイムRz2（図3B、3C、6Aおよび6B）は、in vitroにおいてより高い切断活性を示したRz3（図2）よりも細胞内環境においてより効果的であった（図4）。活性におけるこの差はHIV-1チャレンジにおいて拡大された（図6C）。より安定なRz2を産生する細胞はHIV-1の感染に対してほぼ完全に耐性であったが、安定性のより低いRz3を産生する他の細胞はHIV-1の感染に対して対照細胞と同程度に感受性であった。Rz2の半減期はRz3のその約2倍であったが、どの構造的特徴がRz2をRNaseに対してより耐性に行っているのか、現在のところ不明である。Rz2に較べて、Rz3のリンカー内には6個多いヌクレオチドが含まれていた。このことが高次構造に影響を及ぼしたに相違ない。

【0050】

天然のtRNA分子の半減期は50～60時間であるが(SmithおよびWeinberg, 1981)、Rz2の半減期は約100分に過ぎなかった。tRNA-リボザイムの半減期を伸ばすことができるならば、より高い抑制効果が期待できるであろう。我々は転写物のin vivoにおける相対的安定性をいまだに予測できないのであるが、図1に示すような二次構造を組み込むことによって細胞質に輸送されうるリボザイムを設計することは可能である。転写物の安定性を正確に予測することができないので、我々は通常数個の構築体を試験する。そして、今日までに試験した種々の遺伝子の場合、我々は興味のある遺伝子の発現を>95%の効率で不活性化できるカセットを常に得ることができた(Kawasakiら, 1996, 1998)。

【0051】

tRNA^{Val}-ベクターは、標的分子が細胞質中に局在するリボザイム以外の機能性RNAの発現に有用でありうる。我々の掌中で、tRNA^{Val}-リボザイムは少なくとも培養細胞中では一貫して高い活性を有する。したがって適切に設計されたtRNA^{Val}-リボザイムは、分子生物学における道具として、また医学分野においても役に立つ道具として有用である。

【0052】

【発明の効果】

本発明により、新規なリボザイムおよびその発現系が提供された。本発明のリボザイムはin vivo で安定性が高く、それにより高い活性を呈する。

【0053】

(参考文献)

Adachi, A., Gendelman, H. E., Koenig, S., Folks, T., Willey, R., Rabson, A. and Martin, M. A.(1986) Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. J. Virol., 59, 284-291.

Adeniyi-Jones, S., Romeo, P. and Zasloff, M.(1984) Generation of long read through transcripts in vivo and in vitro by deletion of 3' termination and processing sequences in the human tRNA^{met} gene. Nucleic Acids Res., 12, 1101-1115.

【0054】

Arnld, G. J., Schmutzler, C., Thomann, U., van Tol, H. and Gross, H. J. (1986) The human tRNA^{Val} gene family: organization, nucleotide sequences and homologous transcription of three single-copy genes. Gene, 44, 287-297.

Arts, G.-J., Fornerod, M. and Mattaj, I. W.(1998) Identification of a nuclear export receptor for tRNA. Curr. Biol., 6, 305-314.

【0055】

Bertrand, E., Pictet, R. and Grange, T.(1994) Can hammerhead ribozymes be efficient tools for inactivating gene function? Nucleic Acids Res., 22, 293-300.

Bertrand, E. and Rossi, J. J.(1996) Anti-HIV therapeutic hammerhead ribozymes: targeting strategies and optimization of intracellular function. In Eckstein, F. and Lilley, D. M. J.(eds.), Nucleic Acids

Mol. Biol., Vol.10. Springer-Verlag, Berlin, 301-313.

【0056】

Bertrand, E., Castanotto, D., Zhou, C., Carbonnelle, C., Lee, G. P., Chatterjee, S., Grange, T., Pictet, R., Kohn, D., Engelke, D. and Rossi, J. J. (1997) The expression cassette determined the functional activity of ribozymes in mammalian cells by controlling their intracellular localization. RNA, 3, 75-88.

Boelens, W., Palacios, I. and Mattaj, I. W. (1995) Nuclear retention of RNA as a mechanism for localization. RNA, 1, 273-283.

【0057】

Cotten, M. and Birnstiel, M. (1989) Ribozyme mediated destruction of RNA in vivo. EMBO J., 8, 3861-3866.

Dahm, S. C. and Uhlenbeck, O. C. (1991) Role of divalent metal ions in the hammerhead RNA cleavage reaction. Biochemistry, 30, 9464-9469.

Dahm, S. C., Derrick, W. B. and Uhlenbeck, O. C. (1993) Evidence for the role of solvated metal hydroxide in the hammerhead cleavage mechanism. Biochemistry, 32, 13040-13045.

Dropulic, B., Lin, N. H., Martin, M. A. and Jeang, K. T. (1992) Functional characterization of a U5 ribozyme: intracellular suppression of human immunodeficiency virus type 1 expression. J. Virol., 66, 1432-1441.

【0058】

Eckstein, F. and Lilley, D. M. J. (eds.) (1996) Catalytic RNA, Nucleic Acids and Molecular Biology, Vol.10. Springer-Verlag, Berlin.

Erickson, R. P. and Izant, J. (eds.) (1992) Gene Regulation: Biology of Antisense RNA and DNA; Raven Press, New York.

Fefbeyre, G., Bratty, J., Chen, H. and Cedergren, R. (1996) Cell cycle arrest trans-hammerhead ribozyme action in Yeast. J. Biol. Chem, 271, 19328-19323.

Fujita, S., Koguma, T., Ohkawa, J., Moti, K., Kohda, T., Kise, H.,
Nishikawa, S., Iwakura, M. K. and Taira, K. (1997) Discrimination of
a single base change in a ribozyme using the gene for dihydrofolate
reductase as a selective marker in *Escherichia coli*. *Proc. Natl.*
Acad. Sci. USA, 94, 391-396.

【0059】

Gebhard, J. R., Perry, G. M., Mahadeviah, S. and Witton, J. L. (1997) Use
of a nonviral vector to express a chimeric tRNA-ribozyme against
lymphocytic choriomeningitis virus: cytoplasmic accumulation of a
catalytically competent transcript but minimal antiviral effect.
Antisense and Nucleic Acid Drug Dev. 7, 3-11.

Good, P. D., Krikos, A. J., Li, S. X. L., Lee, N, S., Giver, L.,
Ellington, A., Zaia, J. A., Rossi, J. J. and Engelke, D. R. (1997)
Expression of small, therapeutic RNAs in human cell nuclei. *Gene*
Therapy, 4, 45-54.

Guerrier-Takade, G., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N. and Altman, S.
(1983) The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of
the enzyme. *Cell*, 35, 849-857.

【0060】

Hamblet, N. S. and Castora, F. J. (1995) Mitochondrial DNA deletion
analysis: a comparison of PCR quantitative methods. *Biochem.*
Biophys. Res. Commun., 207, 839-847.

Hasseloff, J. and Gerlach, W. L. (1988) Simple RNA enzymes with new and
highly specific endoribonuclease activities. *Nature*, 334, 585-591.

Huang, Y. and Carmichael, G. G. (1996) Role of polyadenylation in
nucleocytoplasmic transport of mRNA. *Mol. Cell. Biol.*, 16, 1534-
1542.

【0061】

Inokuchi, Y., Yuyama, N., Hirashima, A., Nishikawa, S., Ohkawa, J., and

- Taira, K.(1994) A hammerhead ribozyme inhibits the proliferation of an RNA coliphage SP in *E. coli*. *J. Biol. Chem.*, 269, 11361-11366.
- Ilves, H., Barske, C., Junker, U., Bohnlein, E. and Veres, G.(1996) Retroviral vectors designed for targeted expression of RNA polymerase III-driven transcripts: a comparative study. *Gene*, 171, 203-208.
- Jennings, P. A. and Molloy, P. L.(1987) Inhibition of SV40 replicon function by engineered anitiseense RNA transcribed by RNA polymerase III. *EMBO J*, 6, 3043-3047.
- 【0062】
- Kawasaki, H., Ohkawa, J., Tanishige, N., Yoshinari, K., Murata, T., Yokoyama, K. K. and Taira, K.(1996) Selection of the best target site for ribozyme-mediated cleavage within a fusion gene for adenovirus E1A-associated 300 kDa protein (p300) and luciferase. *Nucleic Acids Res.* 24, 3010-3016.
- Kawasaki, H., Ecker, R., Yao, T.-P., Taira, K., Chiu, R., Livingston, D. M. and Yokoyama, K. K.(1998) Distinct roles of the co-activators p300 and CBP in retinoic-acid-induced F9-cell differentiation *Nature*, 393, 284-289.
- Kruger, K., Grabowski, P. J., Zaug, A. J., Sands, J., Gottschling, D. E. and Cech, T. R. (1982) Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell*, 31, 147-157.

【0063】

- Lott, W. B., Pontius, B. W. and von Hippel, P. H.(1998) A two-metal ion mechanism operates in the hammerhead ribozyme-mediated cleavage of an RNA substrate, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 542-547.
- Murray, J. A. H.(ed.)(1992) *Antisense RNA and DNA*; Wiley-Liss, Inc, New York.

Ohkawa, J., Yuyama, N., Takebe, Y., Nishikawa, S. and Taira, K.(1993)

Importance of independence in ribozyme reactions: kinetic behavior of trimmed and of simply connected multiple ribozymes with potential activity against human immunodeficiency virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 11302-11306.

【0064】

Ojwang, J. O., Hampel, A., Looney, D. J., Wong-Staal, F. and Rappaport, J.(1992) Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 expression by a hairpin ribozyme. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 10802-10806.

Ozawa, T., Tanaka, M., Ikebe, S., Ohno, K., Kondo, T. and Mizuno, Y, (1990) Quantitative determination of deleted mitochondrial DNA relative to normal DNA in parkinsonian striatum by a kinetic PCR analysis. Biochem. Biophys. Res. Commun., 172, 483-489.

【0065】

Perriman, R., Bruening, G., Dennis E. S. and Peacock, W. J.(1995)

Effective ribozyme delivery in plant cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 6175-6179.

Pontius, B. W., Lott, W. B. and von Hippel, P. H.(1997) Observations on catalysis by hammerhead ribozymes are consistent with a two-divalent-metal-ion mechanism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 2290-2294.

Prisley, S., Buonomo, S. B. C., Michienzi, A. and Bozzoni, I.(1997) Use of adenoviral VAI small RNA as a carrier for cytoplasmic delivery of ribozymes. RNA, 3, 677-687.

【0066】

Rossi, J. J. and Sarver, N.(1990) RNA enzymes (ribozymes) as antiviral therapeutic agents. TIBTECH, 8, 179-183.

Rossi, J. J.(1995) Controlled, targeted, intracellular expression of ribozymes: progress and problems. TIBTECH, 13, 301-306.

Sarver, N., Cantin, E. M., Chang, P. S., Zaida, J. A., Ladne, P. A.,

Stepenes, D. A. and Rossi, J. J.(1990) Ribozymes as potential anti-HIV-1 therapeutic agents. *Science*, 247, 1222-1225.

【0067】

Scanlon, K. J.(ed.)(1997) *Therapeutic Applications of Ribozymes; Methods in Molecular Medicine*, Vol.11, Humana Press, New Jersey.

Shimada, T., Fujii, H., Mitsuya, H. and Niehuis, A. W.(1991) Targeted and highly efficient gene transfer into CD4+ cells by a recombinant human immunodeficiency virus retroviral vector. *J. Clin. Invest.*, 88, 1043-1047.

Smith, D. W. and Weinberg, W. C.(1981) Transfer RNA in reticulocyte maturation. *Biochem. Biophys. Acta.*, 655, 195-198.

【0068】

Sullenger, B. A., Lee, T. C., Smith, C. A. and Ungers, G. E.(1990) Expression of chimeric tRNA-driven antisense transcripts renders NIH 3T3 cells highly resistant to Moloney murine leukemia virus replication. *Mol. Cell. Biol.* 10, 6512-6523.

Sullenger, B. A. and Cech, T. R.(1993) Tetheting ribozymes to a retroviral packaging signal for destruction of viral RNA. *Science*, 262, 1566-1569.

【0069】

Taira, K., Nakagawa, K., Nishikawa, S. and Furukawa, K. (1991) Construction of a novel RNA-transcript-trimming plasmid which can be used both in vitro in place of run-off and(G)-free transcriptions and in vivo ad multi-sequence transcription vectors. *Nucleic Acids Res.*, 19, 5152-5130.

Thomas, K. R. and Capecchi, M. R. (1987) Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem sells. *Cell*, 51, 503-512.

【0070】

- Thompson, D. J., Ayers, F. D., Malmstrom, A. T., Ganousis, L. M.,
Chowrira, M. B., Couture, L. and Stinchcomb, T. D. (1995) Improved
accumulation and activity of ribozymes expressed from a tRNA-based
RNA polymerase III promoter. *Nucleic Acids Res.*, 23, 2259-2268.
- Tobian, J. A., Drinkard, L. and Zaseloff, M. (1985) tRNA nuclear
transport: defining the critical regions of human tRNA Met by point
mutagenesis. *Cell*, 43, 415-422.
- Turner, P. C. (ed.) (1997) *Ribozyme Protocols; Methods in Molecular
Biology*, Vol. 74, Humana Press, New Jersey.

【0071】

- Uhlenbeck, O. C. (1987) A small catalytic oligoribonucleotide. *Nature*, 328,
596-600.
- Yamada, O., Kraus, G., Leavitt, M. C., Yu, M. and Wong-Staal, F. (1994)
Activity and cleavage site specificity of an anti-HIV-1 hairpin
ribozyme in human T cells. *Virology*, 205, 121-126.
- Yamada, O., Yu, M., Yee, J.-K., Kraus, G., Looney, D. and Wong-Staal, F.
(1994) Intracellular immunization of human T cells with a hairpin
ribozyme against human immunodeficiency virus type 1. *Gene Therapy*,
1, 38-45.

【0072】

- Yates, J., Warren, N., Reisman, D. and Sugden, B. (1984) A cis-acting
element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable
replication of recombinant plasmids in latently infected cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 3806-3810.
- Yu, M., Ojwang, J. O., Yamada, O., Hmapel, A., Rappaport, J., Looney, D.
and Wong-Staal, F. (1993) A hairpin ribozyme inhibits expression of
diverse strains of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl.
Acad. Sci. USA*, 90, 6340-6344.

【0 0 7 3】

Zhao, J.J. and Pick, K.,(1993) Generating loss-of function phenotypes of the fushitarazu gene with a targated ribozyme in Drosophila. Nature, 365, 448-451.

Zhou, D.-M., Zhang, L.-H., Kumar, P. K. R. and Taira, K. (1996) The ribozyme mechanism revisited: Evidence against direst coordination of a Mg^{2+} ion with the pro-Roxygen of the scissile phosphate in the transition state of a hammerhead ribozyme-catalyzed reaction. J. Am. Chem. Soc., 118, 8969-8970.

【0 0 7 4】

Zhou, D.-M., Zhang, L.-H. and Taira, K.(1997) Explanation by the double-metal-ion mechanism of catalysis for the differential metal ion effects on the cleavage rates of 5'-oxy and 5'-thio substrates by a hammerhead ribozyme. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 14343-14348.

Zhou, D.-M. and Taira, K.(1998) The hydrolysis of RNA: from theoretical calculations to the hammerhead ribozyme-mediated cleavage of RNA. Chem. Rev, 98m 991-1026.

【0 0 7 5】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Director-General of Agency of Industrial Science and Technology

<120> Expression Systems for Transcription of Functional Nucleic Acids

<130> 117F0059

<140>

<141>

<160> 23

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 136

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the nucleotide
sequence of Rz2

<400> 1

accguugguu uccguagugu agugguuauc acguucgccu aacacgcgaa aggucccccgg 60
uucgaaaccg ggcacuacaa acacaacacu gaugaggacc gaaagguccg aaacgggcac 120
gucggaaacg guuuuu 136

<210> 2

<211> 142

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the nucleotide
sequence of Rz3

<400> 2

accguugguu uccguagugu agugguuauc acguucgccu aacacgcgaa aggucccccgg 60
 uucgaaaccg ggcacuacaa accaacadac aacacugaug aggaccgaaa gguccgaaac 120
 gggcacgucg gaaacgguuu uu 142

<210> 3

<211> 128

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the nucleotide
 sequence of Rz1

<400> 3

accguugguu uccguagugu agugguuauc acguucgccu aacacgcgaa aggucccccgg 60
 uucgaaaccg ggcacccaca caacacugau gaguccguga ggacgaaacg ggcaccucga 120
 gcgcuuuu 128

<210> 4

<211> 95

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the nucleotide
 sequence of the transcript of human placental tRNA^{Val}

<400> 4

accguugguu uccguagugu agugguuauc acguucgccu aacacgcgaa aggucccccgg 60

uucgaaaccg ggcggaaaca aagacagucg cUUUU

95

<210> 5

<211> 149

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the nucleotide
sequence of Rz4

<400> 5

accguugguu uccguagugu agugguuauc acguucgccu aacacgcgaa aggucccccg 60
uucgaaaccg ggcacccggg uggcugucac cggaagugcu uuccggucuc augaguccgu 120
gagggcgaaa cagccacucg agcgcuuuu 149

<210> 6

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of a sence oligonucleotide linker

<400> 6

aattcaggac tagtctttta ggtcaaaaag aagaagcttt gtaaccgttg gtttccgtag 60
tgtagtggtt atcacgttcg cctaacacgc gaaaggtccc cggttcgaag 110

<210> 7

<211> 113

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of an antisense oligonucleotide linker

<400> 7

tcgacttcga accggggacc ttctgcgtgt taggcgaacg tgataaccac tacactacgg 60
aaaccaacgg ttacaaagct tcttcttctt ttgacctaa aagactagtc ctg 113

<210> 8

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of a sense oligonucleotide linker

<400> 8

cgaaccggg caccgggga atataacctc gacgcgtttt ttctatcgc gtc 53

<210> 9

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of an antisense oligonucleotide linker

<400> 9

tcgacgcgat agaaaaaaag cgctcgaggt tatattcccc gggcgcccgg tttc 54

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of an upper primer

<400> 10

cgccagggtt tcccagtcac gac 23

<210> 11

<211> 101

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of a lower primer including the sequences of Rzl
and a terminator

<400> 11

ctgcaggatcg acgcgataga aaaaaagcgc tcgaggtgcc cgtttcgtcc tcacggactc 60
atcagtgttg tgtgggtgcc cggtttcgaa ccgggacctt t 101

<210> 12

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of a lower primer including the sequences of Rz2
and a terminator

<400> 12

ctgcaggatcg acgcgataga aaaaaaccgt ttccgacgtg cccgtttcgg tcctttcggc 60
cctcatcagt gttgtgtttg tagtgcccgg ttccgaaccg gggaccttt 109

<210> 13

<211> 106

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of a lower primer including the sequences of Rz3
and a terminator

<400> 13

ctgcaggtcg acgcgataga aaaaaaccgt ttccgacgtg cccgtttcgg tcctcatcag 60
tggtgtgtgt tggtttgttag tgcccgggtt cgaaccgggg accttt 106

<210> 14

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of a probe specific for the reference RNA

<400> 14

aaatcgctat aaaaagcgct cgaggttatg ctccccgggt 40

<210> 15

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of a probe specific for the ribozyme

<400> 15

ctcatctgtg ttgtgt 16

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of a primer for b-actin

<400> 16

gtggccatct cttgctcgaa

20

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of a primer for the ribozyme

<400> 17

gacctttcgg tcctcatc

18

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of an upper oilgonucleotide primer

<400> 18

gactacctca tgaagatcct

20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of a lower oligonucleotide primer

<400> 19

gtggccatct cttgctcgaa

20

<210> 20

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of an upper oligonucleotide primer

<400> 20

gttatcacgt tcgcctaa

18

<210> 21

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of a lower oligonucleotide primer

<400> 21

gacctttcgg tcctcatc

18

<210> 22

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of a probe specific for the ribozyme

<400> 22

acgcgaaagg tccccggt

18

<210> 23

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence
of a probe specific for b-actin

<400> 23

gcgggaaaat cgtgcgtga

19

【 0 0 7 6 】

【配列表フリーテキスト】

【 0 0 7 7 】

【配列番号 1】

配列番号 1 の配列は R z 2 の塩基配列である。

【 0 0 7 8 】

【配列番号 2】

配列番号 2 の配列は R z 3 の塩基配列である。

【 0 0 7 9 】

【配列番号 3】

配列番号 3 の配列は R z 1 の塩基配列である。

【 0 0 8 0 】

【配列番号 4】

配列番号 4 の配列はヒト胎盤 t R N A^{Val} の転写物の塩基配列である。

【 0 0 8 1 】

【配列番号 5】

配列番号 5 の配列は R z 4 の塩基配列である。

【 0 0 8 2 】

【配列番号 6】

配列番号 6 の配列はセンスオリゴヌクレオチドリンカーの塩基配列である。

【0083】

【配列番号7】

配列番号7の配列はアンチセンスオリゴヌクレオチドリンカーの塩基配列である。

【0084】

【配列番号8】

配列番号8の配列はセンスオリゴヌクレオチドリンカーの塩基配列である。

【0085】

【配列番号9】

配列番号9の配列はアンチセンスオリゴヌクレオチドリンカーの塩基配列である。

【0086】

【配列番号10】

配列番号10の配列はアッパープライマーの塩基配列である。

【0087】

【配列番号11】

配列番号11の配列はRz1とターミネーターの配列を含むロアープライマーの塩基配列である。

【0088】

【配列番号12】

配列番号12の配列はRz2とターミネーターの配列を含むロアープライマーの塩基配列である。

【0089】

【配列番号13】

配列番号13の配列はRz3とターミネーターの配列を含むロアープライマーの塩基配列である。

【0090】

【配列番号14】

配列番号14の配列は参照RNAに特異的なプローブの塩基配列である。

【0091】

【配列番号15】

配列番号15の配列はリボザイムに特異的なプローブの塩基配列である。

【0092】

【配列番号16】

配列番号16の配列は β -アクチン用のプライマーの塩基配列である。

【0093】

【配列番号17】

配列番号17の配列はリボザイム用のプライマーの塩基配列である。

【0094】

【配列番号18】

配列番号18の配列はアッパーオリゴヌクレオチドプライマーの塩基配列である。

【0095】

【配列番号19】

配列番号19の配列はローア-オリゴヌクレオチドプライマーの塩基配列である。

【0096】

【配列番号20】

配列番号20の配列はアッパーオリゴヌクレオチドプライマーの塩基配列である。

【0097】

【配列番号21】

配列番号21の配列はローア-オリゴヌクレオチドプライマーの塩基配列である。

【0098】

【配列番号22】

配列番号22の配列はリボザイムに特異的なプローブの塩基配列である。

【0099】

【配列番号23】

配列番号23の配列は β -アクチンに特異的なプローブの塩基配列である。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、コンピュータフォールディングによって予測された $tRNA^{Val}$ -リボザイムの二次構造を示す。ハンマーヘッド型リボザイムの配列（太い大文字）を種々のリンカー配列を介して $tRNA^{Val}$ 配列（大文字）の下流に連結した。7塩基欠失 $tRNA^{Val}$ の内部プロモーターに対応する配列、すなわちAおよびBボックスは影を付けて囲って示してある。図A～Dは、それぞれ $tRNA^{Val}$ -リボザイム1（Rz1）、2（Rz2）、3（Rz3）および4（Rz4）の二次構造を示す。リボザイムの認識アームを下線をつけて示す。図Eはヒト胎盤 $tRNA^{Val}$ の転写物の二次構造を示す。 $tRNA$ は3つの部位（矢じりのマーク）でプロセシングされ、成熟 $tRNA^{Val}$ （大文字）を生じる。

【図2】

図2は、*in vitro*における $tRNA^{Val}$ -リボザイムによって媒介される切断を示す。パネルAは基質RNAを図式的に表す。（基質RNAはpNL432のヌクレオチド第500～711、すなわちHIV-1 RNAのU5領域に対応する。）この基質RNAは $tRNA^{Val}$ -リボザイムによって2個の断片に切断された（5'切断産物：70量体；3'切断産物：156量体）。パネルBは切断反応の結果を示すオートラジオグラムである。レーン：M - マーカー；ベクター - リボザイムをもたない $tRNA^{Val}$ ベクター単独；Rz1 - リボザイム1；Rz2 - リボザイム2；およびRz3 - リボザイム3。

【図3】

図3は、*in vivo*における $tRNA^{Val}$ -リボザイムの安定性を示す。パネルAは、参照遺伝子の使用によりトランスフェクション効率の標準化を可能としたpUC-Rrを図式的に表す。参照遺伝子はリボザイム発現カセットの下流で発現された。2つの発現カセットにおいて、プロモーターおよびターミネーターの配列はそれぞれ同一であった。パネルBは $tRNA^{Val}$ -リボザイムの発現の定常レベルを

示す。図はリボザイムに特異的なプローブ（上）および参照遺伝子に特異的なプローブ（下）を用いたノーザンブロット分析を示す。図Cは、安定にリボザイムを導入した細胞における $tRNA^{Val}$ -リボザイムの半減期を示す。図中、○は $tRNA^{Val}$ -リボザイム1（Rz1）の相対量を示す。□および◇は、それぞれ $tRNA^{Val}$ -リボザイム2（Rz2）および3（Rz3）の相対量を示す。横棒は3回のアッセイによる結果のS.E.を示す。

【図4】

図4は、HeLa細胞におけるU5 LTR-ルシフェラーゼ融合遺伝子の産生抑制。パネルA。HeLa細胞における一過性発現。標的発現プラスミドおよびリボザイムをコードするpUCdt-Rzの両方を用いてHeLa細胞を同時トランスフェクションした。パネルB。安定にリボザイムを導入した細胞における一過性発現。各構築物につき、挿入遺伝子（ $tRNA^{Val}$ または $tRNA^{Val}$ -リボザイム）の転写物のレベルが類似している2つの独立したクローンを選択した。リボザイム産生HeLa細胞のトランスフェクションには、標的発現プラスミドのみを用いた。横棒は5回のアッセイによる結果のS.E.を示す。

【図5】

図5は、HIV ベクターの図式的表示である。各 $tRNA^{Val}$ -リボザイムのための発現カセットを、HIV-1由来ベクター（A）のTK-neo^rのすぐ上流に位置するSalI部位に挿入し、 $tRNA^{Val}$ -リボザイムをコードするレトロウイルスベクターHIVRibo.N（B）を得た。Ψはパッケージングシグナルを示す。

【図6】

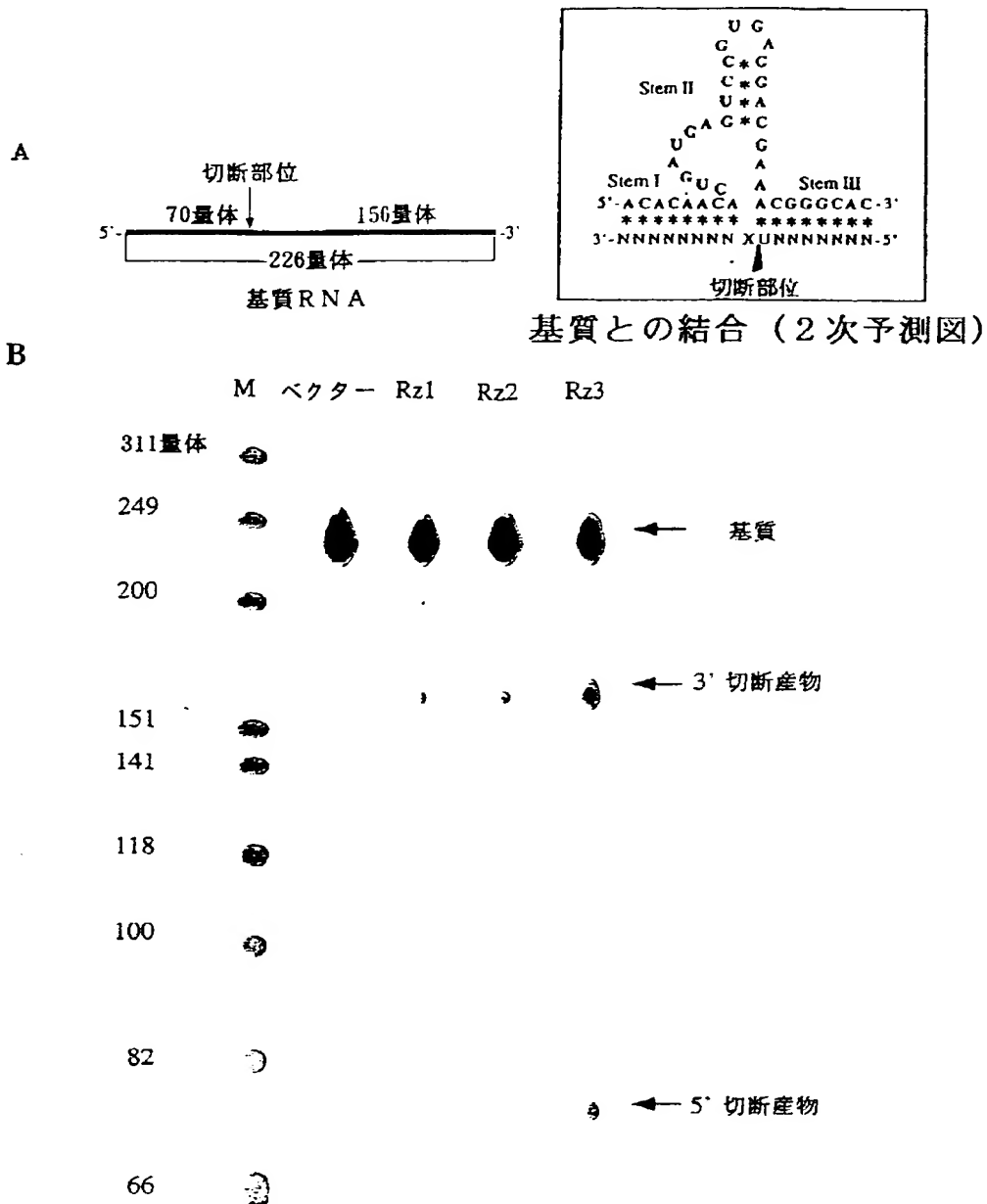
図6は、安定にリボザイムを導入したH9細胞(CD4⁺ T細胞)における $tRNA^{Val}$ -リボザイム発現の定量化、および上記導入細胞におけるp24産生の抑制を示す。パネルA。リボザイム導入H9細胞の2個の独立したクローン由来のRT-PCR増幅リボザイムのサザンブロット分析の結果（図Bに示す）の定量化。13、15および17サイクル後のPCR産物を、³²P標識オリゴヌクレオチドプローブを用いてサザンブロッティングにより分析した。図中、四角および丸はそれぞれリボザイム2（Rz2）およびリボザイム3（Rz3）を導入した細胞を用いた結果を示す。パネルB。サザンブロッティングの結果。パネルC。HIV-1 NL432を感

染させた後、細胞を11日間培養した。3、7および11日目に各培養物から少量の上清を調製した。HIV-1抗原捕獲ELISAによりp24抗原のレベルを測定した。図中、三角はtRNA^{Val}-リボザイム1(Rz1)の結果を示す。四角および丸はそれぞれリボザイム2(Rz2)およびリボザイム3(Rz3)の結果を示す。三角は対照細胞を用いた場合の結果を示す。

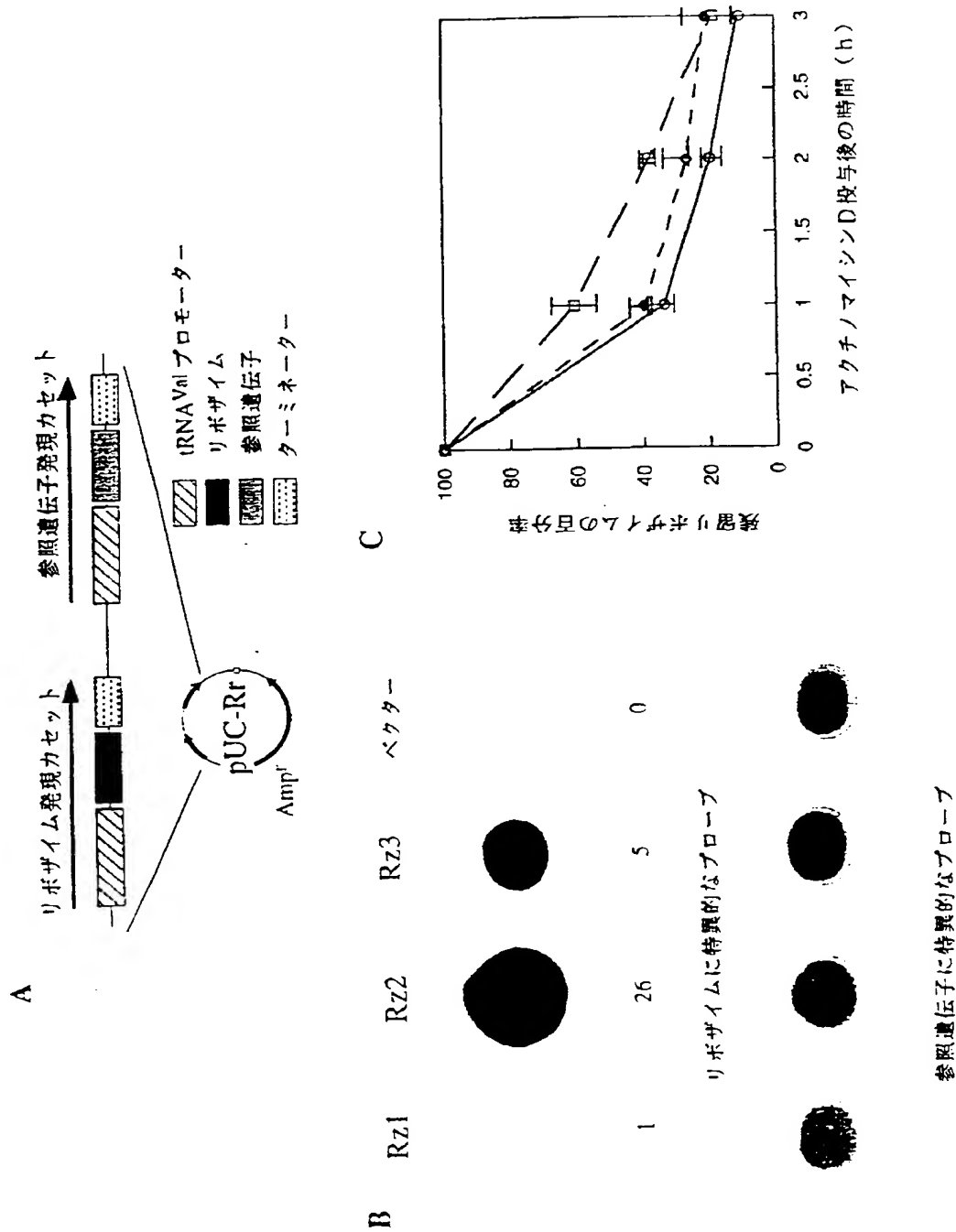
【図7】

図7は、tRNA^{Val}-リボザイムの細胞内局在を示す。各細胞内画分由来のRNAを用いてノーザンブロット分析を実施した。リボザイム遺伝子を安定に導入した細胞(図4Bに結果を示す実験に用いたtRNA^{Val}-リボザイム産生HeLa細胞)から核RNAおよび細胞質RNAを別々に調製した。パネルAおよびCは、tRNA^{Val}-リボザイムに特異的な³²P標識プローブを用いて得た結果を示す。BおよびDは対照を示す。天然のU6遺伝子の転写物に特異的なプローブを用いて、細胞質画分の汚染を調べた。

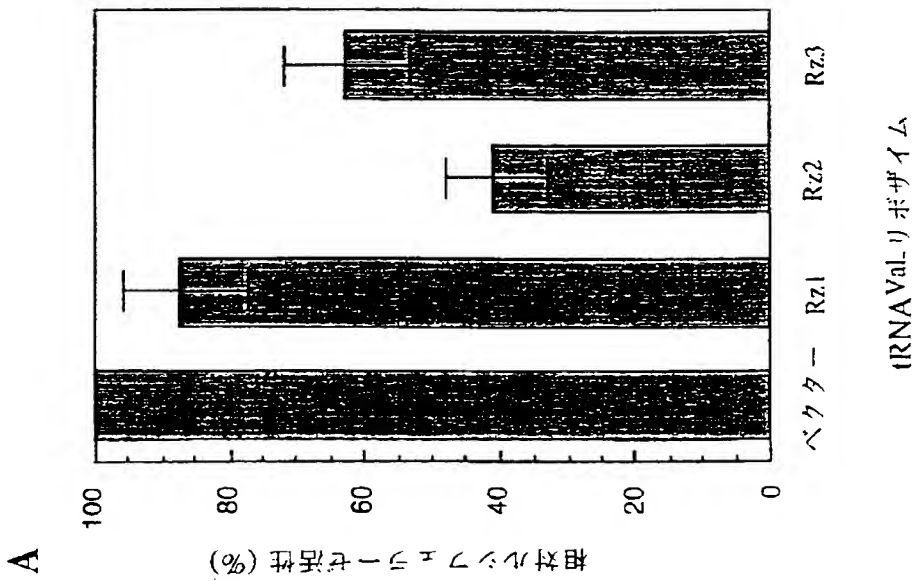
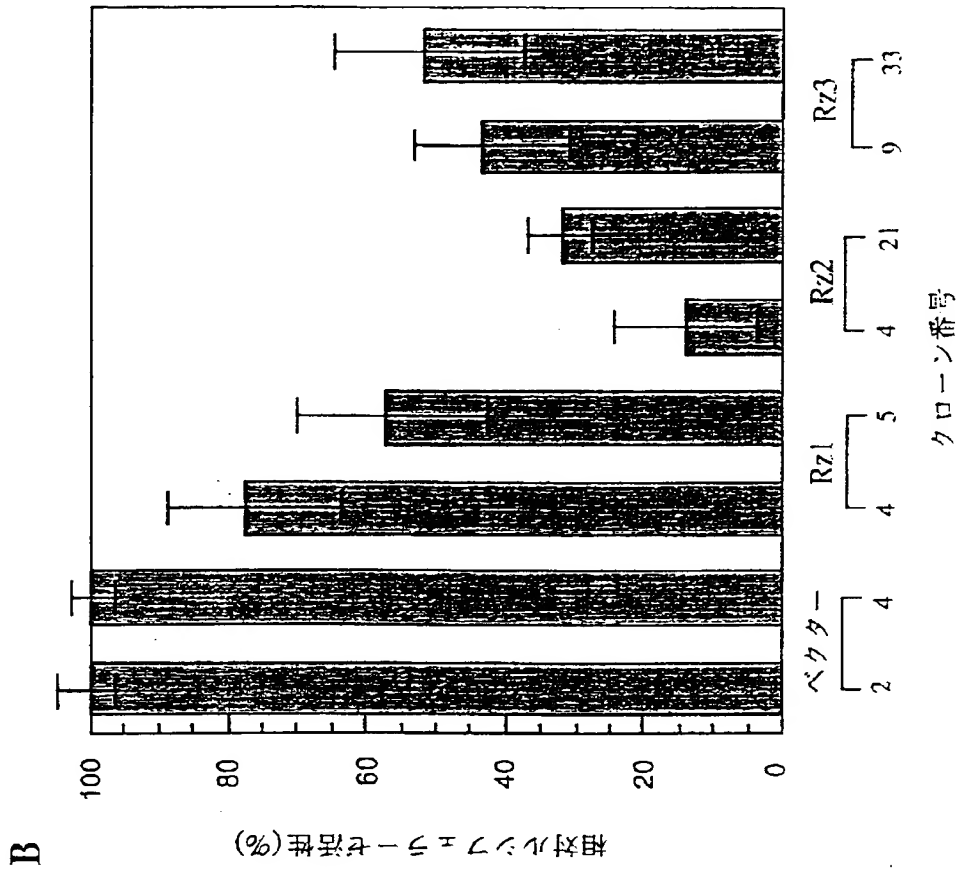
【図 2】



【図 3】

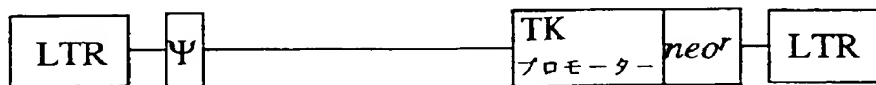


【図 4】

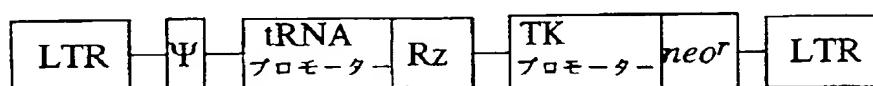


【図 5】

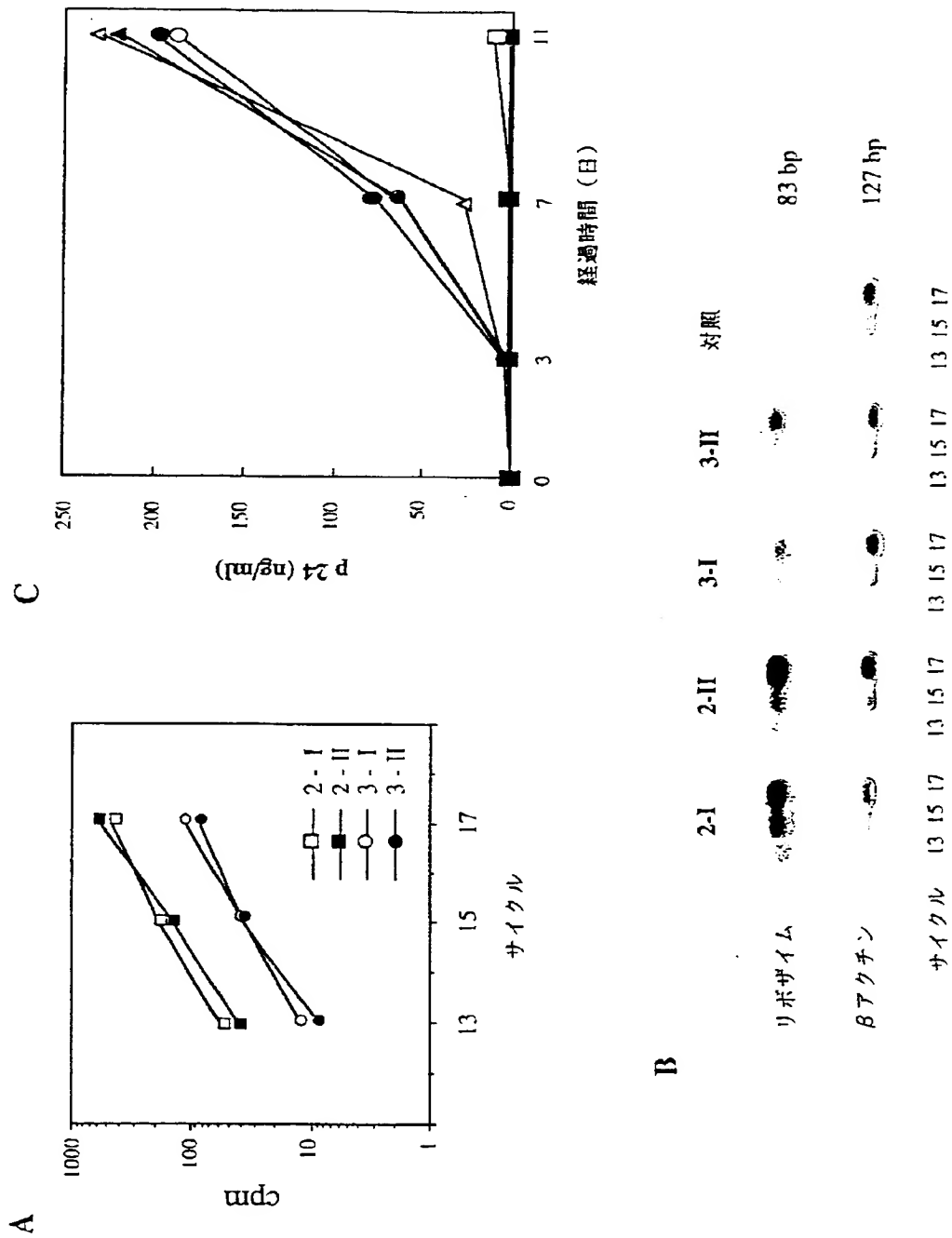
A



B



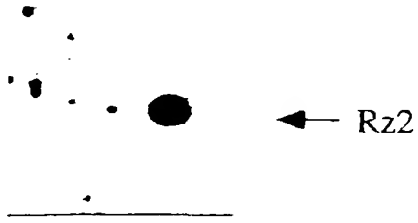
【図 6】



【図 7】

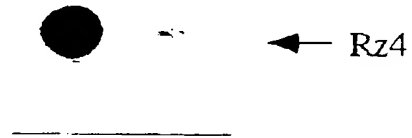
A

核
細胞質



C

核
細胞質



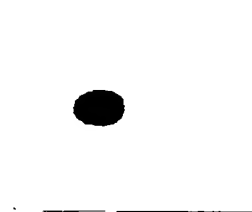
B

核
細胞質



D

核
細胞質



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規なりボザイムおよびその発現系の提供。

【解決手段】 下記の塩基配列(I) または(II)を持つヌクレオチド配列を含むリボザイム。

塩基配列(I): 5'-ACCGUUGGUUCCGUAGUGUAGUGGUUAUCACGUUCGCCUAACACGCGAAAGGUCC
CCGGUUCGAAACCGGGCACUACAAACACAACACUGAUGAGGACCGAAAGGUCCGAAACGGGCACGUCGAAA
CGGUUUUU-3'

塩基配列(II): 5'-ACCGUUGGUUCCGUAGUGUAGUGGUUAUCACGUUCGCCUAACACGCGAAAGGUC
CCCGGUUCGAAACCGGGCACUACAAACCAACACACAACACUGAUGAGGACCGAAAGGUCCGAAACGGGCACG
UCGGAACGGUUUU-3'

【選択図】 なし

【書類名】

職権訂正データ

【訂正書類】

特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

000001144

【住所又は居所】

東京都千代田区霞が関1丁目3番1号

【氏名又は名称】

工業技術院長

【代理人】

申請人

【識別番号】

220000415

【住所又は居所】

茨城県つくば市東1-1-4

【氏名又は名称】

工業技術院産業技術融合領域研究所長

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001144]

1. 変更年月日	1990年 9月20日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都千代田区霞が関1丁目3番1号
氏 名	工業技術院長